

## アルコール摂取により生じる血清 $\alpha_1$ -acid glycoprotein 異常に関する臨床的及び実験的検討

松 本 修 二

札幌医科大学内科学第4講座 (主任 漆崎一朗 教授)

### Clinical and Experimental study on the Abnormalities of Serum $\alpha_1$ -Acid Glycoprotein Induced by Ethanol Intake

Shuji MATSUMOTO

Department of Internal Medicine (Section 4), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. I. Urushizaki)

The quantitative and qualitative differences of serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AG) derived from normal subjects and alcoholic patients were investigated. The serum concentration of  $\alpha_1$ -AG in normal subjects and alcoholics was  $66.0 \pm 16.5$  mg/dl and  $84.3 \pm 22.5$  mg/dl, respectively. The mean value of  $\alpha_1$ -AG in alcoholics was significantly higher than that of normal subjects ( $p < 0.05$ ). The sialic acid content of purified  $\alpha_1$ -AG from alcoholics was 0.08 mg/mg protein and 70% lower than that of normal subjects. This difference chiefly reflected the increase of asialo form of  $\alpha_1$ -AG in alcoholics, which was confirmed by two dimensional isoelectric focusing-crossed immunoelectrophoresis. After two weeks of abstinence from alcohol, the serum asialo- $\alpha_1$ -AG level tends to return to the normal level. These results suggest that the increase of asialo- $\alpha_1$ -AG may reflect the retardation of hepatic uptake. The effect of ethanol on the hepatic clearance of serum glycoproteins was examined. An experimental analysis using ethanol fed rats was conducted. Male Wistar rats were fed with Lieber's ethanol containing diet for 7 days. The half life of  $^{125}\text{I}$ -labelled asialo- $\alpha_1$ -AG in ethanol fed rats was 3.0 minutes, whereas that of normal controls was 1.8 minutes. Also the number of asialoglycoprotein receptors was decreased and the endocytotic rate of asialo- $\alpha_1$ -AG was retarded significantly.

These results suggest that an increase of serum asialo- $\alpha_1$ -AG level in alcoholics is mainly due to the impairment of the asialoglycoprotein uptake by the hepatocytes.

(Received July 7, 1987 and accepted July 27, 1987)

**Key words:** Serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, Alcoholics, Asialoglycoprotein Hepatic clearance, Asialoglycoprotein receptor

### 1 結 言

生体に摂取されたエタノール (EtOH) は主に肝細胞内のアルコール脱水素酵素 (ADH) によりアセトアルデヒド (MeCHO) に酸化され、次いでアセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の作用で酢酸に酸化される<sup>1)</sup>。EtOH あるいはその中間代謝産物である MeCHO は肝細胞骨格の一つである肝微小管蛋白と結合し、その重合を阻害し微小管数を減少させ<sup>2,3)</sup>、この減少が肝細胞からの糖蛋白質やリポ蛋白質の分泌障害の主因と考え

られている<sup>4-6)</sup>。これらの分泌障害をうけた蛋白質は、結果的に肝細胞内に貯留し、アルコール性肝障害に特徴的な肝細胞風船様変化をきたすとされている<sup>7)</sup>。

一方, EtOH, MeCHO による障害には、肝での蛋白質分泌障害のみならず, albumin<sup>8)</sup>, transferrin<sup>9)</sup> の合成障害や、糖蛋白質の glycosylation の障害<sup>10)</sup> も同時に生じるとされ、臨床的にも 1976 年, Stibler *et al.*<sup>11)</sup> が大量飲酒者血清中に等電点 (pI) の変化した desialo-transferrin の存在を等電点電気泳動法により証明し、アルコール性肝障害の新たな生化学的指標となりうる

と報告している. このように EtOH による肝での蛋白質合成, 分泌障害, 血中への異常糖蛋白質出現などの血清糖蛋白質代謝障害が, EtOH の metabolic effect として注目される分野となっているが, 現在までの報告では主に肝での蛋白質合成低下, 分泌障害に起因するものとされ, もう一つの肝細胞の重要な機能である蛋白質の異化過程への EtOH の影響に関する報告はない. この肝臓への糖蛋白質の選択的な取り込みは, 血漿中の糖蛋白質を構成する糖鎖部分からシアル酸が除去され, ガラクトース残基が露出し, アシアロ糖蛋白質の状態となり, 肝細胞膜表面の asialoglycoprotein receptor (AGPR) に結合して急速に流血中より肝細胞内に取り込まれることによりおこなわれるが<sup>12-14)</sup>, この過程が EtOH によりいかなる影響を受けるかが問題となる.

そこで著者は, 大酒家血清を用いて血清酸可溶性蛋白質 acid soluble glycoprotein (ASP) と  $\alpha_1$ -acid glycoprotein ( $\alpha_1$ -AG),  $\alpha_1$ -antitrypsin ( $\alpha_1$ -AT), haptoglobin, transferrin, hemopexin, ceruloplasmin,  $\alpha_2$ -macroglobulin の 7 種の血清糖蛋白質濃度を測定した. そのうち量的異常をきたした  $\alpha_1$ -AG についてその糖鎖変化を, 抽出した  $\alpha_1$ -AG のシアル酸含量と等電点二次元交叉免疫電気泳動法による sialo-及び asialo- $\alpha_1$ -AG の定量化により明らかにした. さらに, EtOH 投与ラットを用いて  $\alpha_1$ -AG のクリアランスを *in vivo* 及び *in vitro* で検討し, EtOH 投与による肝細胞表面の AGPR 数及びリガンド (asialo- $\alpha_1$ -AG) の internalization の速度の変化に起因する血中の  $\alpha_1$ -AG の質的, 量的異常を検討したので報告する.

## 2 対象及び実験方法

### 2.1 対 象

正常者 10 名 (男 5 名, 女 5 名, 平均年齢 32.4 歳), 日本酒に換算し 3 合/日, 3 年以上の飲酒歴を持ち, HB virus 関連抗原・抗体陽性者, 肝硬変症患者を除外した 23 名 (男 21 名, 女 2 名, 平均年齢 45.7 歳) の血清を用いた. このうち採血時, 血中に EtOH を証明できた 7 名 (Table 1) については大酒家群として禁酒前, 禁酒後 2 週間の採血を行なった. 大酒家群 7 名のうち CRP 陽性者は 1 名であり, 6 名は陰性であった. また, 末梢血白血球数はいずれも正常範囲にあり, 明らかな炎症性疾患は認めなかった.

### 2.2 血清酸可溶性糖蛋白質の定量法

血清酸可溶性糖蛋白質 (ASP) は, 血清 100  $\mu$ l に 0.6 M 過塩素酸 1 ml を加え, 20 分間室温に静置後, 10,000  $\times$  g, 20 分間遠心し得られた上清 200  $\mu$ l に対し Coomassie brilliant blue G-250 酸性溶液 (大塚アッセイ研究所) 3 ml を加え, 590 nm の波長で吸光度を測定した. ブランクは蒸留水を用い, 標準溶液は ASP 標準 (大塚アッセイ研究所) を 100 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl の濃度に調製し用いた.

### 2.3 各種血清糖蛋白質の定量法

血清糖蛋白質として,  $\alpha_1$ -AG,  $\alpha_1$ -AT, transferrin,  $\alpha_2$ -macroglobulin, ceruloplasmin, haptoglobin, hemopexin の 7 種を Partigen (ヘキストジャパン) を用いた single radial immunodiffusion 法<sup>15)</sup> で測定した.

### 2.4 血清 $\alpha_1$ -AG の抽出法及びシアル酸含量の測定法

Lange の方法<sup>16)</sup> に準じ, 血清 5 ml に 25 ml の蒸留水を加え, さらに氷酢酸で pH 4.9 に調整後 20 mM sodium acetate buffer, pH 4.9 で平衡化した DEAE-

Table 1 Clinical background of alcoholic patients.

|                  |                                |                              |       |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|-------|
| Age              | 45 $\pm$ 10.5(22~66) years old |                              |       |
| Sex              | male 7, female 0,              |                              |       |
| CRP              | (-)6,                          | (+)1,                        | (2+)0 |
| WBC              | 6,360                          | $\pm$ 1,338 /mm <sup>3</sup> |       |
| Total protein    | 6.91 $\pm$                     | 0.49 g/dl                    |       |
| GOT              | 44.6 $\pm$                     | 25.3 IU/l                    |       |
| GPT              | 24.6 $\pm$                     | 19.9 IU/l                    |       |
| GOT/GPT          | 2.71 $\pm$                     | 2.93                         |       |
| $\gamma$ -GTP    | 46.2 $\pm$                     | 29.1 IU/l                    |       |
| choline esterase | 1.00 $\pm$                     | 0.20 $\Delta$ pH             |       |
| sialic acid      | 88.1 $\pm$                     | 11.7 mg/dl                   |       |
| serum ethanol    | 195.8 $\pm$                    | 15.7 mg/dl                   |       |

トヨパール 650-M (東洋ソーダ) カラム (2×5 cm) に添加, その後 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.3 で洗浄, 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.0 で溶出し, 蒸留水で透析後, 凍結乾燥した. 精製した  $\alpha_1$ -AG を 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 に溶解し, その蛋白濃度は, BIO-RAD protein assay キット (BIO-RAD 社) で測定し, シアル酸は, 糖鎖をノイラミニダーゼ, アルドラゼ処理し, N-アセチルノイラミン酸として測定する, シアル酸測定キット (極東製薬) を用いた.

## 2.5 $\alpha_1$ -AG の等電交叉点二次元免疫電気泳動法

### 2.5.1 薄層ポリアクリルアミド等電点電気泳動法

一次元目の等電点電気泳動は, ポリアクリルアミド濃度を 5.4% とし, 両性担体として, Servalyt pH 2-3, 2-4, 3-5, 4-7 (Serva 社) をそれぞれ 3:2:1:1 の割合で混合し, 最終濃度を 2.5% とした. ゲルの大きさは, 1×70×250 mm とし, 血清 40  $\mu$ l をゲル端にのせた濾紙片 (3×7 mm) に添加, 12 検体を同時に泳動した. 電極液は, 陽極に 1 N リン酸, 陰極に 1 N 水酸化ナトリウムを使用し, 泳動装置は 2117 MULTIPHOR II (LKB 社) を用い, 4°C 冷却下で 200 V 定電圧, 12 時間泳動した. 泳動後, ゲルを 1 cm 幅に切断し veronal buffer, pH 8.6 に 10 分間浸し平衡化した.

### 2.5.2 二次元交叉免疫電気泳動法

二次元電気泳動は, 抗ヒト  $\alpha_1$ -AG ウサギ血清 (Dako 社) 3  $\mu$ l/ml を含む, 1% アガロース (Agarose C, Pharmacia 社), veronal buffer, pH 8.6 を 10×10 cm のガラス平板上に厚さ 1 mm になるように作成, アガロースゲル上に 2.5.1 で得られたポリアクリルアミドゲル片を泳動方向と直角に置き, 泳動装置は自作の多検体処理可能な水平電気泳動装置 (12×50×5 cm) で veronal buffer, pH 8.6 を用い, 5 mA, 定電流で 18 時間泳動した. 泳動後, 一昼夜生理食塩水で洗浄し, 0.2% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma 社) で染色し, 沈降線を得た.

## 2.6 等電点二次元電気泳動後の sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の同定法及び定量法

Sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の同定は, ヒト  $\alpha_1$ -AG (Sigma 社), 及びそれを固定化ノイラミニダーゼ (Sigma 社) で 37°C, 1 時間, 処理した asialo- $\alpha_1$ -AG をそれぞれ 20  $\mu$ g を泳動し, sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の易動度を確認し, 血清から得られた沈降線のうち, それぞれ易動度と一致するピークの面積を測定し, その相対比率を算出した. この相対比率と 2.3 で求めた  $\alpha_1$ -AG 濃度から血清の sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の各濃度を

算出した.

## 2.7 ラットへの EtOH 投与法

体重 180~200 g の Wistar 系雄性ラット (北海道実験動物センター) 30 匹に Lieber and DeCarli の方法<sup>17)</sup> に従って調製された液体飼料 (オリエンタル酵母) を, EtOH 群 15 匹は 5% EtOH を添加して与え, 対照群 15 匹は EtOH を等カロリーのショ糖で置換して与え, 7 日間飼育した.

## 2.8 ラット肝の組織学的所見

飼育開始 7 日目の両群ラットより肝を摘出し, 10% ホルマリンで固定後, 肝組織切片を作製, Hematoxylin eosin (HE) で染色し, 組織学的変化を光学顕微鏡で観察した.

## 2.9 *In vivo* での $\alpha_1$ -AG, asialo- $\alpha_1$ -AG の血中クリアランスの検討

ヒト  $\alpha_1$ -AG 及び 2.4 で調製した asialo- $\alpha_1$ -AG を Hunter の方法<sup>18)</sup> によりクロラミン T を用いて <sup>125</sup>I 標識し, 飼育 7 日目の EtOH 群, 対照群ラットにエーテル麻酔下で内頸静脈よりそれぞれ 15  $\mu$ g (20  $\mu$ Ci)/0.5 ml を静注し, 10 秒後, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30 分後に対側の内頸静脈より 0.1 ml ずつ採血し, その放射能を Wallac autogamma-counter model 1282 (LKB 社) を用いて計測し, 10 秒後の放射能を 100% として sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の血中クリアランスを検討した.

## 2.10 ラット遊離肝細胞と <sup>125</sup>I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG との binding study

### 2.10.1 ラット遊離肝細胞の調製

飼育 7 日目の EtOH 群, 対照群ラットより, Seglen の方法<sup>19)</sup> に従い, collagenase 灌流法で遊離肝細胞を得た. すなわち, ラットをエーテル麻酔下に開腹し, 門脈にカニューレーションし, 前灌流液 (130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 2.2 mM ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetra acetic acid (EGTA), 4.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucose, pH 7.2) 50 ml で灌流し, 続いて collagenase 溶液 (0.05% Collagenase Type I, Sigma 社), 0.005% Trypsin inhibitor Type II-S (Sigma 社), 130 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 3.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, 2.2 mM EGTA, 4.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucose, pH 7.5) 250 ml で灌流後, 肝を摘出し, 同溶液中で細切し, 4 層ガーゼで濾過して結合織, 大細

胞塊を除去した。得られた肝細胞浮遊液を Hanks 液 (日水製薬) で、 $50 \times g$ , 1 分間遠心し, 3 回洗浄後, 沈渣を肝実質細胞として用い, 0.1% 牛血清アルブミン (片山化学) 含有 Eagle MEM 培地 (日水製薬) で  $1 \times 10^6$  個/ml の細胞濃度に調製した。分離肝細胞の viability は trypan blue による dye exclusion test で確認した。

#### 2・10・2 遊離肝細胞と $^{125}\text{I}$ 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG との経時的結合

対照群, EtOH 群ラット肝より 2・10・1 に従い遊離肝細胞をそれぞれ調製し, Weigel and Oka の方法<sup>20)</sup> に準じて  $1 \times 10^6$  個の遊離肝細胞を 0.1% 牛血清アルブミン含有 Eagle MEM 培地 1 ml 中に浮遊させ,  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG を終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  に添加し,  $4^\circ\text{C}$  で経時的にインキュベートした。1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 分後に  $4^\circ\text{C}$  に冷却した Hanks 液で肝細胞を 3 回洗浄し, 肝細胞に結合した放射能を測定し, 肝細胞表面の AGPR に対する  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG の経時的結合を検討した。

#### 2・10・3 肝細胞表面の AGPR 数の測定

2・10・1 で調製した遊離肝細胞に対し  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG を終濃度 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  までの濃度に加え,  $4^\circ\text{C}$ , 80 分間インキュベートし, Hanks 液で肝細胞を 3 回洗浄, 肝細胞に結合した放射能を測定し, 濃度依存性の結合を検討した。非特異的結合は,  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG 濃度の 100 倍量の非標識 asialo- $\alpha_1$ -AG を加えた時の放射能より測定し, 前者より差し引いて特異的結合を算出し, Scatchard plot 解析<sup>21)</sup> を行った。

#### 2・10・4 遊離肝細胞の $^{125}\text{I}$ 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG の取り込みと internalization

Asialo- $\alpha_1$ -AG は AGPR と結合後, receptor とともに endocytosis される<sup>22)</sup>。その internalization の動態を検討するため, Schwartz *et al.*<sup>23)</sup> の方法に従い, 2・10・1 で調製した対照群及び EtOH 群の遊離肝細胞  $1 \times 10^6$  個を  $4^\circ\text{C}$  に冷却し,  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG を終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  になるように加え,  $4^\circ\text{C}$ , 80 分間インキュベートした。その後, 細胞を  $4^\circ\text{C}$  に冷却した Hanks 液で 3 回洗浄し, あらかじめ  $37^\circ\text{C}$  に温めた Eagle MEM 培地中に浮遊させ, Hanks 液中で, 再培養した。Asialo- $\alpha_1$ -AG と AGPR との結合は,  $\text{Ca}^{2+}$  イオン依存性であり, EGTA などのキレート剤で可逆的に阻害されることを利用し<sup>24)</sup>, 再培養開始後, 2, 4, 6, 8, 10, 15 分後に  $4^\circ\text{C}$  に冷却した Hanks 液で 1 回洗浄し, 得られた肝細胞沈渣に 5 mM EGTA 添加 Hanks 液 1 ml を加え, 2 分間,  $4^\circ\text{C}$  でインキュベートした。その後,

$50 \times g$ , 1 分間遠心し, 上清を吸引, 得られた肝細胞沈渣の放射能を測定し, 肝細胞内に取り込まれた  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG 量の経時変化を検討した。この結果から肝細胞への asialo- $\alpha_1$ -AG の internalization の速度を算出した。

#### 2・11 統計学的処理

本文中の数値は平均値, 標準偏差であらわし, 有意差の検定は Student の t-test により危険率が 0.05 以下の場合を有意とした。

### 3 結 果

#### 3・1 血清酸可溶性糖蛋白質 (ASP) 及び各種血清糖蛋白値

正常者及び大酒家の APS 値,  $\alpha_1$ -AG,  $\alpha_1$ -AT, transferrin,  $\alpha_2$ -macroglobulin, haptoglobin, hemopexin 及び ceruloplasmin 値を Fig. 1 に示した。ASP 値は正常者  $110.5 \pm 12.3 \text{ mg/dl}$  (平均  $\pm$  SD), 大酒家  $165.0 \pm 54.0 \text{ mg/dl}$  で,  $\alpha_1$ -AG 値は正常者  $66.0 \pm 16.5 \text{ mg/dl}$ , 大酒家  $84.3 \pm 22.5 \text{ mg/dl}$  であり, それぞれの危険率は前者で 1% 以下, 後者で 5% 以下でありそれぞれ有意の上昇を認めた。 $\alpha_1$ -AT 値は正常者  $226.0 \pm 42.0 \text{ mg/dl}$ , 大酒家  $282.0 \pm 90.0 \text{ mg/dl}$ , transferrin 値は正常者  $315 \pm 47 \text{ mg/dl}$ , 大酒家  $288 \pm 123 \text{ mg/dl}$ ,  $\alpha_2$ -macroglobulin 値は正常者  $227 \pm 45 \text{ mg/dl}$ , 大酒家  $277 \pm 127 \text{ mg/dl}$  であり, 正常者と大酒家の間に有意差を認めなかった。Haptoglobin, hemopexin, ceruloplasmin 値も同様に有意差を正常者と大酒家間に認めなかった。

ASP は, 急性反応性蛋白分画であるため<sup>25)</sup>, 同じ急性反応性蛋白である  $\alpha_1$ -AG 及び  $\alpha_1$ -AT と相関をみると, Fig. 2 A に示すように ASP と  $\alpha_1$ -AG は相関係数  $r = 0.845$  ( $n = 23$ ),  $\alpha_1$ -AT とは (Fig. 2 B)  $r = -0.064$  ( $n = 23$ ) であり, ASP 分画と  $\alpha_1$ -AG で有意な正の相関をみた ( $P < 0.01$ )。

#### 3・2 大酒家の血清 $\alpha_1$ -AG のシアル酸含量

正常者及び大酒家各 3 名の血清から  $\alpha_1$ -AG を抽出した結果を Table 2 に示した。正常者及び大酒家の血清  $\alpha_1$ -AG 値はそれぞれ  $66.5 \pm 5.6 \text{ mg/dl}$ ,  $101.3 \pm 10.9 \text{ mg/dl}$  であり, DEAE-イオン交換クロマトグラフィーで得られた  $\alpha_1$ -AG 量は血清 1 ml から正常者で  $510 \pm 60 \mu\text{g}$ , 大酒家で  $750 \pm 75 \mu\text{g}$  であり, その回収率は, 正常者で  $76.8 \pm 2.4\%$ , 大酒家で  $74.1 \pm 0.6\%$  で両者間に有意差を認めなかった。両者の  $\alpha_1$ -AG 1 mg あたりのシアル酸含量は, 正常者  $0.12 \pm 0.02 \text{ mg}$ , 大酒家  $0.08 \pm 0.01 \text{ mg}$  と大酒家から抽出した  $\alpha_1$ -AG のシアル酸含量

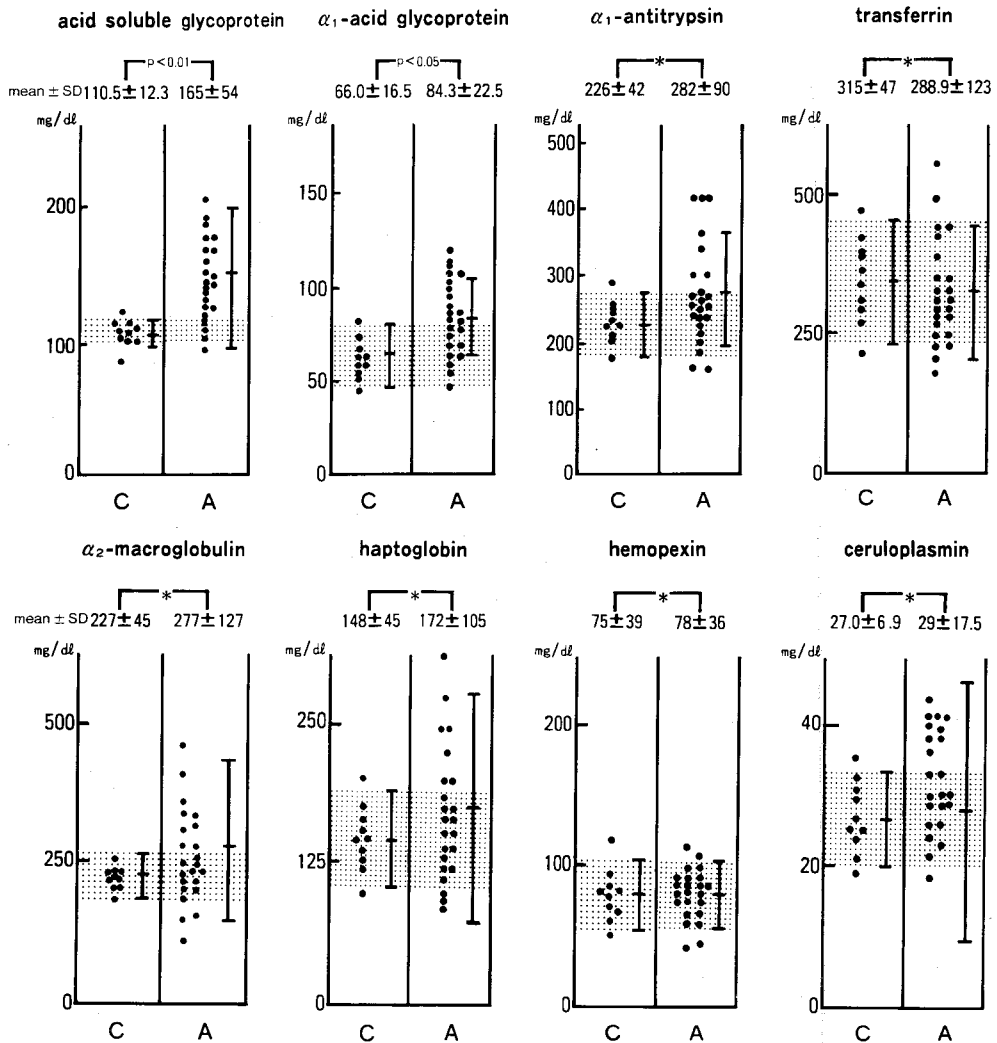


Fig. 1 Concentration of serum acid soluble glycoprotein(ASP),  $\alpha_1$ -acid glycoprotein,  $\alpha_1$ -antitrypsin, transferrin,  $\alpha_2$ -macroglobulin, haptoglobin, hemopexin and ceruloplasmin in control subjects(C) and alcoholics(A).

の有意な低下をみた。

### 3.3 血清 $\alpha_1$ -AG の等電点-交叉免疫電気泳動所見

一次元目のポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動の pH 勾配は pH 2.0 から pH 5.8 までであった。Fig. 3 に示すように  $\alpha_1$ -AG(A) は pI 2.0~2.7 で, asialo- $\alpha_1$ -AG(B) は pI 4.7~5.2 に泳動され sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の分離は充分可能であった。

血清の等電点二次元交叉免疫電気泳動後の結果を Fig. 3 に示す。正常者及び大酒家とも pH 2.0~3.3 のピーク (P1) と pH 4.8~5.2 のピーク (P2) を認めた。Sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の易動度と対比すると P1 は sialo- $\alpha_1$ -AG, P2 は asialo- $\alpha_1$ -AG と一致した。この P1, P2 の面積を比較すると、正常者 (Fig. 4 A)

では、P1 が明らかに大きく、大酒家 (Fig. 4 B) では asialo- $\alpha_1$ -AG と一致する P2 の面積の増加が認められる。正常者 7 名、大酒家 7 名の血清  $\alpha_1$ -AG の絶対量と、P1, P2 の相対比率から算出した sialo- $\alpha_1$ -AG, asialo- $\alpha_1$ -AG 量を Table 3 に示した。総  $\alpha_1$ -AG 量は、正常者  $65.7 \pm 5.8$  mg/dl, 大酒家禁酒前  $130.4 \pm 29.3$  mg/dl と、大酒家で有意の上昇を認めた。Sialo- $\alpha_1$ -AG 量とその総  $\alpha_1$ -AG 量に対する相対比率は、正常者  $59.6 \pm 4.2$  mg/dl,  $86.2 \pm 1.5\%$ , 大酒家禁酒前  $96.8 \pm 31.0$  mg/dl,  $73.3 \pm 10.7\%$  と大酒家で sialo- $\alpha_1$ -AG の絶対量の増加と相対比率の低下を認めた。これに対し asialo- $\alpha_1$ -AG 量とその相対比率は、正常者  $8.8 \pm 2.5$  mg/dl,  $13.7 \pm 1.5\%$ , 大酒家禁酒前

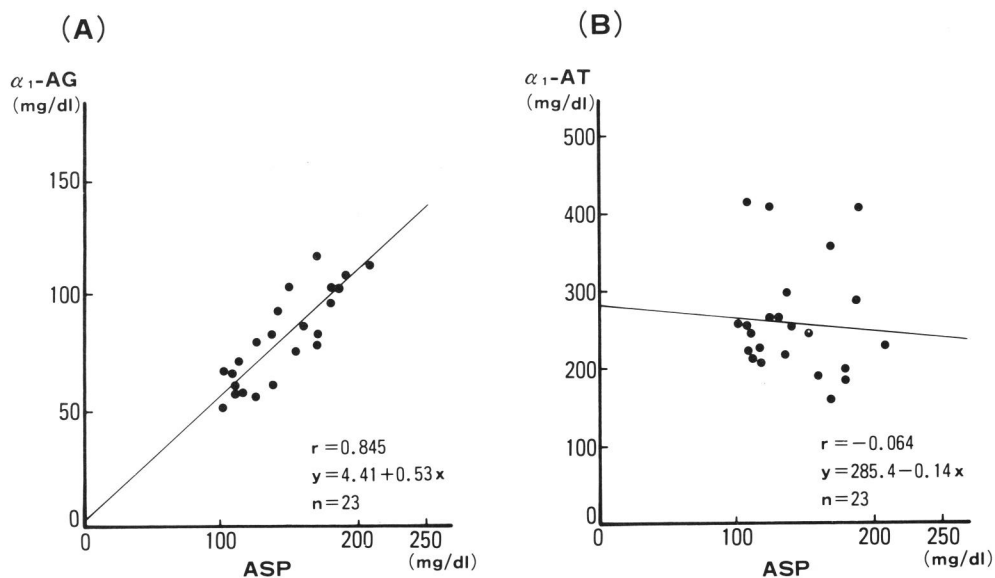


Fig. 2 Correlation between  $\alpha_1$ -acid glycoprotein( $\alpha_1$ -AG)(A),  $\alpha_1$ -antitrypsin( $\alpha_1$ -AT)(B) and acid soluble glycoprotein(ASP) in alcoholic patients.

Tebble 2 The content of sialic acid/purified  $\alpha_1$ -AG in control subjects and alcoholic patients.

|                    | serum $\alpha_1$ -AG level<br>(mg/dl) | amount of<br>purified $\alpha_1$ -AG<br>( $\mu$ g/ml serum) | % recovery     | content of<br>sialic acid<br>(mg/mg protein) |
|--------------------|---------------------------------------|---|----------------|--|
| control            | 66.5 $\pm$ 5.6                        | 510 $\pm$ 60  | 76.8 $\pm$ 2.4 | 0.12 $\pm$ 0.02                              |
| alcoholic patients | 101.3 $\pm$ 10.9                      | 750 $\pm$ 75  | 74.1 $\pm$ 0.6 | 0.08 $\pm$ 0.01                              |

a : p<0.01

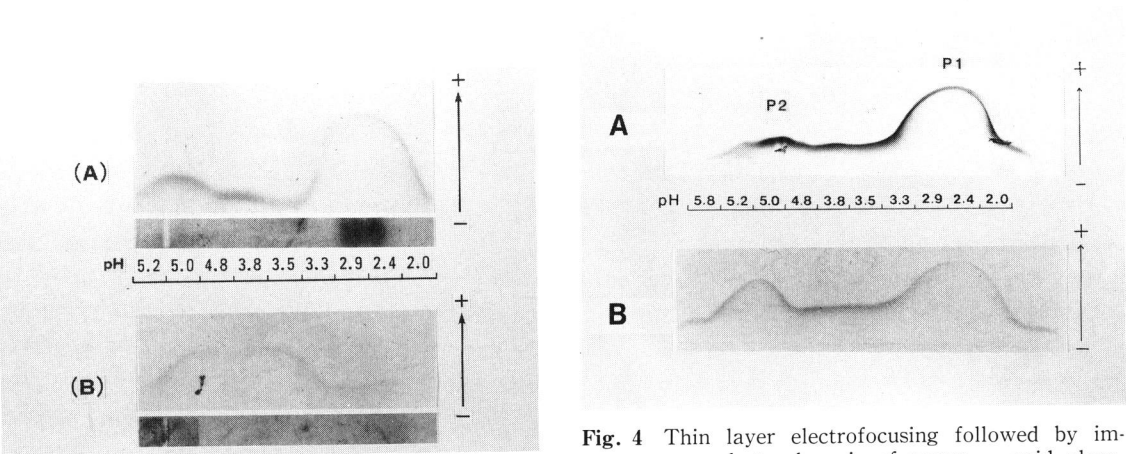


Fig. 3 Thin layer electrofocusing followed by immunoelectrophoresis of purified human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein(A) and human asialo- $\alpha_1$ -acid glycoprotein(B).

Fig. 4 Thin layer electrofocusing followed by immunoelectrophoresis of serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in normal subjects(A) and alcoholic patients(B). Peak 1(P1) and peak 2(P2) represent sialo- and asialo-form of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein.

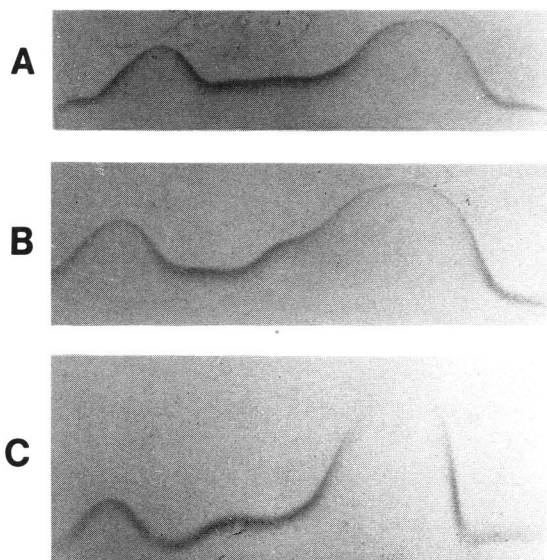


Fig. 5 Changes of two dimensional isoelectric focusing crossed immunoelectrophoresis of serum  $\alpha_1$ -acid glycoprotein in alcoholic patients after abstinence from alcohol. Before abstinence (A), a week after abstinence (B), 2 weeks after abstinence (C).

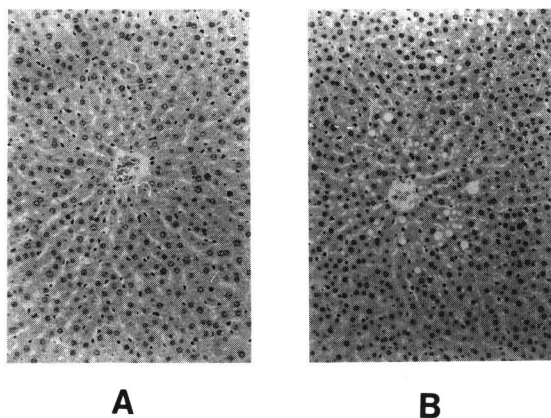


Fig. 6 Light microscopic picture of the liver specimen of obtained from (A) control and (B) ethanol fed rat. (HE $\times$ 95)

$33.6 \pm 12.1$  mg/dl,  $26.7 \pm 10.7\%$ と大酒家で asialo- $\alpha_1$ -AGは絶対量, 相対比率ともに有意に上昇していた。

次に大酒家の禁酒前後の sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG の変化を検討した。禁酒前, 禁酒後1週間, 2週間の血清を等電点交叉二次元免疫電気泳動した結果を Fig. 5 に示す。禁酒前 (Fig. 5 A) 増加していた asialo form の  $\alpha_1$ -AG は禁酒後1週目 (Fig. 5 B) でやや減少し, 2

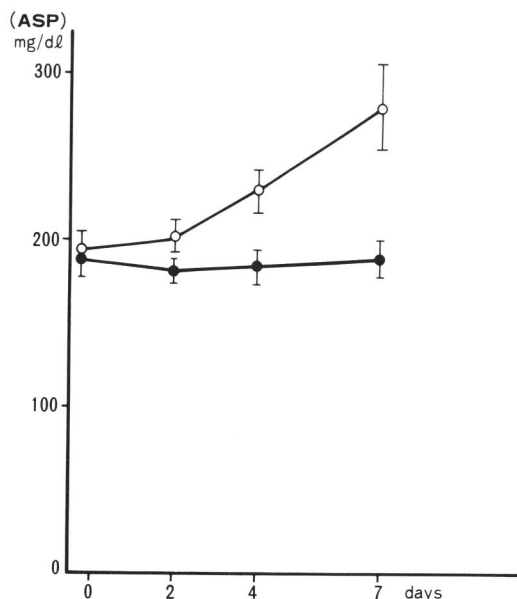


Fig. 7 Serial changes of serum acid soluble glycoprotein (ASP) after ethanol intake in Wistar rats (● control rats, ○ ethanol fed rats).

週目 (Fig. 5 C) ではさらに減少していた。禁酒前と禁酒後2週目の総  $\alpha_1$ -AG 量, sialo- $\alpha_1$ -AG 量, asialo- $\alpha_1$ -AG 量を比較すると, 禁酒前では, それぞれ  $130.4 \pm 26.3$  mg/dl,  $96.8 \pm 31.0$  mg/dl (相対比率  $73.3 \pm 10.7\%$ ),  $33.6 \pm 12.1$  mg/dl (相対比率  $26.7 \pm 10.7\%$ ) であるのに対して, 禁酒後2週目ではそれぞれ  $108.4 \pm 23.0$  mg/dl,  $85.2 \pm 19.9$  mg/dl (相対比率  $78.7 \pm 4.2\%$ ),  $23.2 \pm 5.2$  mg/dl (相対比率  $21.6 \pm 4.2\%$ ) となり, sialo- $\alpha_1$ -AG 値は禁酒前後では有意な変化を認めなかったが, 総  $\alpha_1$ -AG, asialo- $\alpha_1$ -AG 量は有意に低下した (Table 3)。

### 3・4 EtOH 投与後のラット体重, 肝重量及び肝組織所見の変化

飼育開始後7日目のラット体重は, 対照群  $208 \pm 2.0$  g, EtOH 群  $204 \pm 5.0$  g であり, 肝重量は前者で  $20 \pm 2.2$  g, 後者で  $21 \pm 1.2$  g で有意差はなかった。同時期の肝切片 HE 染色標本を Fig. 6 に示した。Fig. 6 B の EtOH 群では, 小葉中心に脂肪滴の沈着を認めたが, 線維化, 炎症細胞浸潤は認められず, 脂肪肝の初期像と考えられた。

### 3・5 ラット血清 ASP 値の変動

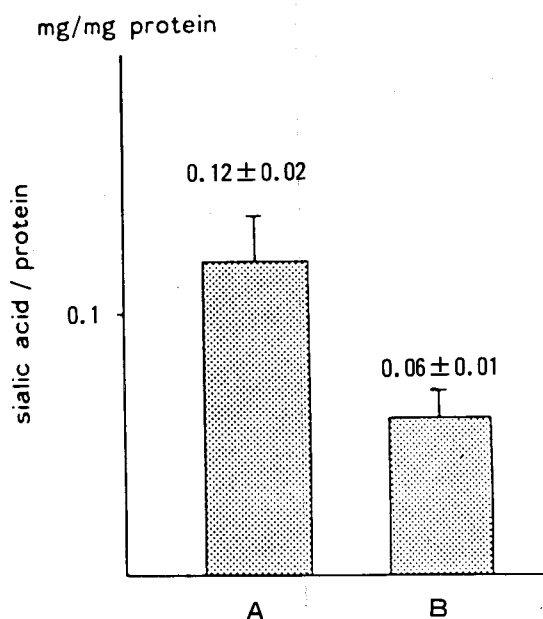
Fig. 7 に示すように飼育開始前の ASP 値は  $190 \pm 20$  mg/dl であったが, 飼育開始後2日目より EtOH 群の ASP 値の上昇を認め, 7日目には  $280 \pm 40$  mg/dl と有意に増加した。一方, 対照群では7日目でも  $188 \pm 19$

**Table 3** Concentration of serum  $\alpha_1$ -AG, sialo- $\alpha_1$ -AG and asialo- $\alpha_1$ -AG in control subjects, before and after abstinence from alcohol.

|                              | total serum $\alpha_1$ -AG<br>(mg/dl) | sialo- $\alpha_1$ -AG (mg/dl)<br>(% of total $\alpha_1$ -AG) | asialo- $\alpha_1$ -AG (mg/dl)<br>(% of total $\alpha_1$ -AG) |
|------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| Control                      | 65.7 $\pm$ 5.8                        | 56.9 $\pm$ 4.2<br>(86.2 $\pm$ 1.5)                           | 8.8 $\pm$ 2.5<br>(13.7 $\pm$ 1.5)                             |
| Alcoholics before abstinence | 130.4 $\pm$ 26.3                      | 96.8 $\pm$ 31.0<br>(73.3 $\pm$ 10.7)                         | 33.6 $\pm$ 12.1<br>(26.7 $\pm$ 10.7)                          |
| after abstinence             | 108.4 $\pm$ 23.0                      | 85.2 $\pm$ 19.9<br>(78.7 $\pm$ 4.2)                          | 23.2 $\pm$ 5.2<br>(21.6 $\pm$ 4.2)                            |

a:  $p < 0.01$ , b:  $p < 0.05$ , c: no significance

Total serum  $\alpha_1$ -AG levels were measured by the method of single radial immunodiffusion. Sialo- and asialo- $\alpha_1$ -AG levels were estimated by two dimensional isoelectric focusing-crossed immunoelectrophoresis.



**Fig. 8** Sialic acid/protein ratio of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein after ethanol ingestion (control(A) ethanol fed rats(B)).

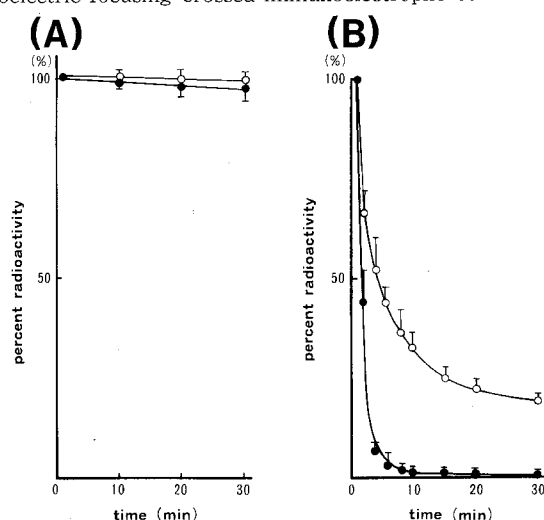
mg/dl と飼育開始前と有意差は認められなかった。

### 3・6 ラット血清 $\alpha_1$ -AG のシアル酸含量

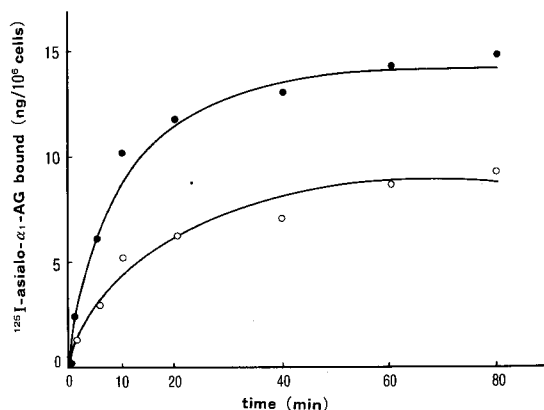
抽出した  $\alpha_1$ -AG の蛋白 1 mg あたりのシアル酸含量は, Fig. 8 A の対照群 0.12  $\pm$  0.02 mg に対し, Fig. 8 B の EtOH 群では 0.06  $\pm$  0.01 mg と後者で有意に低下していた。

### 3・7 *In vivo* における $\alpha_1$ -AG の血中クリアランスの検討

静注した  $^{125}$ I 標識  $\alpha_1$ -AG は Fig. 9 A に示すように, 対照群, EtOH 群ともに, 0~30 分まではほとんど代謝されず, 両群間にも有意差はみられなかった。これに対して, ノイラミニダーゼ処理した  $^{125}$ I 標識 asialo-



**Fig. 9** Disappearance of  $^{125}$ I-labelled  $\alpha_1$ -acid glycoprotein(A) and  $^{125}$ I-labelled asialo- $\alpha_1$ -acid glycoprotein(B) in rats taking control diet(●) or those taking alcohol diet(○).



**Fig. 10** Binding curve of  $^{125}$ I-labelled asialo- $\alpha_1$ -acid glycoprotein to isolated rat hepatocytes at 4°C (● control rat hepatocytes, ○ alcohol fed rat hepatocytes).



$\alpha_1$ -AG (Fig. 9 B) は、両群ともに静注直後より急速に血中より消失し、10 分後には、対照群で95%以上が消

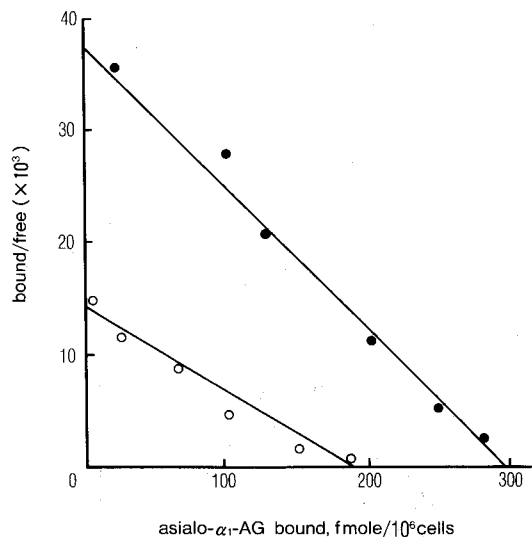


Fig. 11 Scatchard plot analysis of asialo- $\alpha_1$ -acid glycoprotein binding to isolated hepatocytes at 4°C (● control rat hepatocytes, ○ alcohol fed rat hepatocytes).

失したのに対し、EtOH 群では67±3%の消失がみられたのみであった。その半減期を算出すると、EtOH 群3.0±0.2分で、対照群の1.8±0.3分比べEtOH 群で有意に血中クリアランスの遅延を認めた。

### 3・8 肝細胞表面の asialoglycoprotein receptor 数の変化

遊離肝細胞の viability は EtOH 群、対照群とともに90%以上であった。

4°Cにおける遊離肝細胞と<sup>125</sup>I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG との経時的結合は Fig. 10 のように約40分で plateau に達し、遊離肝細胞10<sup>6</sup>個に対する結合は、インキュベート後1分より差が認められ、完全に平衡状態となった80分後では、対照群で14 ng の<sup>125</sup>I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG が結合したが、EtOH 群では7.5 ng の結合と、対照群の約50%に低下していた。

また、濃度依存性の結合をもとに Scatchard plot 解析を行い Fig. 11 に示した。肝細胞1個あたりの AGPR 数は、対照群で $(1.8 \pm 0.2) \times 10^5$ /細胞であるのに対し、EtOH 群では $(1.1 \pm 0.1) \times 10^5$ /細胞と有意に減少していた。<sup>125</sup>I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG と AGPR との結合定数

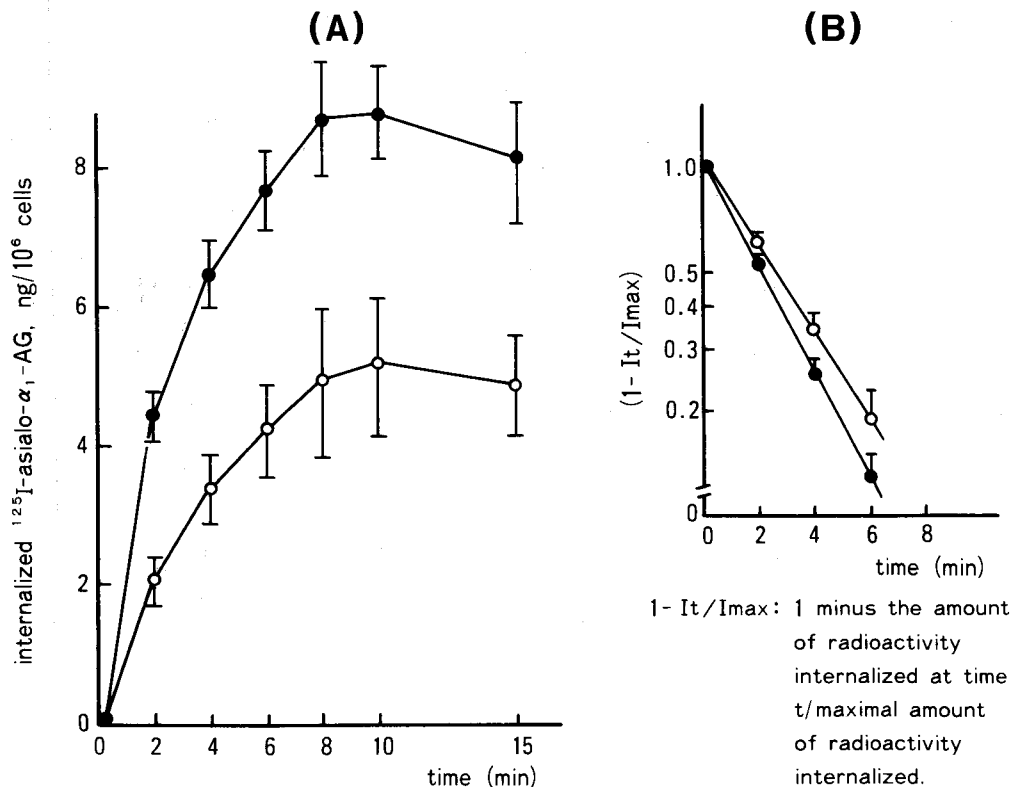


Fig. 12 Internalization of <sup>125</sup>I-labelled asialo- $\alpha_1$ -acid glycoprotein to isolated rat hepatocytes (● control rat hepatocytes, ○ alcohol fed rat hepatocytes).

は、対照群で  $1.01 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ , EtOH 群で  $0.79 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  と EtOH 群で低下傾向を認めた。

### 3・9 遊離肝細胞の $^{125}\text{I}$ 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG の取り込みと internalization の速度

4°C で肝細胞表面の AGPR に結合した  $^{125}\text{I}$  標識 asialo- $\alpha_1$ -AG は、37°C で再培養開始後、対照、EtOH 両群とも経時的に細胞内に取り込まれ 10 分後にピークとなり遊離肝細胞  $10^6$  個あたり対照群で  $8.8 \pm 0.7 \text{ ng}$ , EtOH 群で  $5.2 \pm 0.9 \text{ ng}$  の asialo- $\alpha_1$ -AG が internalization された (Fig. 12 A). この曲線から Fig. 12 B に示したように、最大に internalization された asialo- $\alpha_1$ -AG 量を 1 としたとき、経時的に internalization された率を 1 より減じ、縦軸を片対数表示でその half time をみると、対照群で  $2.2 \pm 0.2$  分, EtOH 群で  $2.7 \pm 0.3$  分と後者で internalization に要する時間が有意に ( $p < 0.05$ ) 延長していた。

## 4 考 察

EtOH 摂取は肝の蛋白質代謝に影響を与えることが知られているが、現在までの報告は、肝での蛋白質の合成低下<sup>8,9)</sup>、分泌障害<sup>4-6)</sup>、glycosylation の障害<sup>10)</sup>などが主で、EtOH は肝での蛋白質の合成、分泌に対して抑制的に働くと考えられている。これらの現象から大酒家血清中の肝由来の蛋白質は減少することが予想されたが、低下する糖蛋白は認められず、むしろ ASP,  $\alpha_1$ -AG は有意に増加していた。

ASP,  $\alpha_1$ -AG は急性反応性蛋白として知られており<sup>25)</sup>、この ASP は  $\alpha_1$ -AG 70%,  $\alpha_1$ -AT 10%,  $\alpha_2$  heat stable glycoprotein 10% などからなる複合急性反応蛋白である<sup>26)</sup>。大酒家血清中の ASP と  $\alpha_1$ -AG 値は強い正の相関を示すことから、ASP 値は  $\alpha_1$ -AG 値を反映していると考えられ、EtOH 摂取により  $\alpha_1$ -AG が増加するものと考えられた。EtOH による他の糖蛋白質増加の報告は、Skrede *et al.*<sup>27)</sup> がアルコール性肝硬変症患者血清中の  $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_2$ -macroglobulin, total iron binding capacity (TIBC) を測定し、 $\alpha_1$ -AT,  $\alpha_2$ -macroglobulin の有意な増加を報告し、Mihás<sup>28)</sup> もアルコール性肝炎患者血清中の  $\alpha_1$ -AT 上昇を指摘しているが、その明らかな原因を特定することはできなかった。

$\alpha_1$ -AG の合成は主に肝で行われ<sup>29,30)</sup>、その他一部は炎症にもなっており、好中球、リンパ球、単球などで作られる<sup>31)</sup>。今回、 $\alpha_1$ -AG の上昇を呈した大酒家の背景因子を分析すると、白血球数、CRP 値、血清シアル酸値などの炎症状態を示唆する検査値は正常範囲内にあっ

た。また、EtOH を投与したラットの動物実験でも肝に炎症細胞浸潤がないにもかかわらず ASP 値が上昇している事より、炎症細胞による合成亢進が  $\alpha_1$ -AG 値を上昇させているとは考え難く、EtOH の  $\alpha_1$ -AG 異化過程におよぼす影響を検索することが重要と考えられた。

血清中の  $\alpha_1$ -AG の異化に関する研究は、Lenten and Ashwell<sup>32)</sup>、Morell *et al.*<sup>13)</sup> を中心に展開され、 $\alpha_1$ -AG を含めた血清糖蛋白は血清中で糖鎖末端のシアル酸残基が取り除かれ、ガラクトース残基が露出すると、すみやかに血清中から肝細胞に取り込まれる。

EtOH により  $\alpha_1$ -AG の異化障害が存在し、しかもそれが肝細胞への取り込み障害によるとするならば、血中に増加した  $\alpha_1$ -AG の糖鎖は変化し、特にシアル酸の低下した asialo form の  $\alpha_1$ -AG が増加することが予想された。実際に大酒家血清中の  $\alpha_1$ -AG を抽出し、シアル酸含量を測定すると、正常の 70% にシアル酸含量は低下しており、また等電点二次元交差免疫電気泳動法で、asialo form の  $\alpha_1$ -AG の分離定量を試みたところ、大酒家血清中には pI 4.9 の asialo- $\alpha_1$ -AG の増加を証明できた。同様の大酒家血清中の糖蛋白の質的異常に関する報告は、Stibler and Borg<sup>33)</sup> が血清 transferrin を薄層ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動法により、大酒家で pI の異なる asialo-transferrin の存在を、三宅ら<sup>34)</sup> が  $\alpha_1$ -AT の pI の異常を報告したことにとどまり、かつその成立機序についてはまったく触れられていなかった。著者はこれらの異常蛋白出現機序が、肝細胞への取り込み障害であることを推察し、その機序をより明確にするために EtOH 投与後 7 日目のラットを用いて糖蛋白のクリアランスを検討した。EtOH 投与後 7 日目のラットは、体重及び肝重量には対照群と有意の差がなく、しかも血清 ASP 値は明らかに増加していたため、糖蛋白のクリアランスの検討に適しているものと考えられた。トレーサーとしては、ヒト  $\alpha_1$ -AG を用いたが、Lenten and Ashwell<sup>35)</sup> により  $\alpha_1$ -AG の代謝が種特異性が少ないとされ、ラット肝を用いた *in vivo* のクリアランスの検討に使用可能な方法である。Intact な sialo- $\alpha_1$ -AG はほとんど代謝されず、また対照群ラットに投与された asialo- $\alpha_1$ -AG は静注後約 5 分でその 90% 以上は血中より消失し、Morell *et al.*<sup>13)</sup> の報告と一致したが、EtOH 投与群では静注後 5 分でもその約 40% は血中に存在し、明らかに asialo- $\alpha_1$ -AG のクリアランスの延長が認められた。今回、トレーサーとして使用した asialo- $\alpha_1$ -AG はノイラミナーゼ処理により  $\alpha_1$ -AG を asialo 化したものであり、EtOH 投与ラットと対照ラットで明らかな差が認められたことよ

り asialo- $\alpha_1$ -AG を摂取する肝細胞側の因子によりクリアランスが延長していると考えられた。この因子として Pricer and Ashwell<sup>36)</sup> により報告された、肝細胞原形質膜に存在するアシアロ糖蛋白と結合する活性部位、即ち AGPR が想定された。EtOH 投与により AGPR 数は  $1.1 \times 10^5$ /細胞と対照の  $1.8 \times 10^5$ /細胞に比し明らかに減少し、asialo  $\alpha_1$ AG と AGPR との結合定数も低下傾向を示したことから AGPR の量的、質的異常が示唆された。この AGPR の減少による糖蛋白のクリアランスの低下をきたす原因としては、EtOH 投与によりラットの肝細胞膜蛋白の合成低下をきたすという報告<sup>37)</sup>や、EtOH 投与ラット肝細胞膜の総シアル酸量は減少するという報告<sup>38)</sup>と関連づけられるが、いずれの報告も大まかな膜蛋白全体としてみているため直接的な証明になっていない。さらに、リガンド (asialo- $\alpha_1$ -AG) の internalization の速度も EtOH 投与ラット肝細胞で低下しており、receptor の endocytosis に重要な働きをする細胞内微小管も EtOH により減少する事などから、EtOH による AGPR の減少は、その合成障害、結合部位の変化に加えて endocytosis の障害も考慮されねばならないと考えられた。

## 5 結 論

大酒家血清中の ASP と 7 種の糖蛋白濃度を測定し、このうち量的異常をきたした  $\alpha_1$ -AG について質的検索をするとともに、動物実験からその出現機序について検討し、以下の成績を得た。

(1) 大酒家血清中の  $\alpha_1$ -AG 値は  $84.3 \pm 22.5$  mg/dl と正常者の  $66.0 \pm 16.5$  mg/dl に対して有意に増加していた。

(2) 大酒家血清中に増加した  $\alpha_1$ -AG を抽出しそのシアル酸含量を測定すると、正常者の約 70% に減少しており、EtOH を投与したラットでもヒトと同様の結果であった。

(3) 等電点二次元交差免疫電気泳動法で血清中の sialo-, asialo- $\alpha_1$ -AG を分離、定量したところ、asialo- $\alpha_1$ -AG 濃度は正常者  $8.8 \pm 2.5$  mg/dl に対し大酒家で  $33.6 \pm 12.1$  mg/dl であり、asialo- $\alpha_1$ -AG の上昇を認めた。この asialo- $\alpha_1$ -AG の上昇は禁酒後 2 週間有意に低下し、可逆的な変化であった。

(4) 大酒家の血清 asialo- $\alpha_1$ -AG の上昇機序を解明するために EtOH 投与ラットを用い、 $\alpha_1$ -AG のクリアランスを測定したところ、静脈内に投与された  $^{125}$ I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG は急速に血中より減少し、その半減期は対照群 1.8 分であるのに対し、EtOH 群では 3.0 分と明

らかな遅延を認めた。

(5) 4℃ においてのラット遊離肝細胞と  $^{125}$ I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG との結合反応の Scatchard plot 解析により求めた EtOH 投与ラットの肝細胞表面の AGPR 数は  $1.1 \times 10^5$ /細胞と対照群の  $1.8 \times 10^5$ /細胞に比し明らかに減少していた。

(6) 遊離肝細胞による  $^{125}$ I 標識 asialo- $\alpha_1$ -AG の endocytotic rate は EtOH 群で対照群の約 80% に低下し、internalization が障害されていた。

これらの実験成績から EtOH 摂取により血清中の  $\alpha_1$ -AG の量的、質的異常が出現し、その原因として従来いわれている EtOH による肝での糖蛋白の合成、分泌障害のみではなく、肝細胞表面の AGPR からの asialoglycoprotein のクリアランス障害が関与するものと考えられた。

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さった本学内科学第 4 講座、漆崎一朗教授に深謝いたします。また、直接御指導、御協力いただいた高後 裕講師、並びに教室員諸兄に心から感謝いたします。

## 文 献

1. 中西 史： アルコールの代謝。肝胆臓 2, 19-26 (1981)。
2. Matsuda, Y., Baraona, E., Salaspuro, M. and Lieber, C. S.: Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus. Lab. Invest. 41, 455-463 (1979)。
3. 森 道夫, 小山田正人, 横川全弥, 奥 雅志, 山口潤, 小野江為則： アルコール性脂肪肝と肝細胞の微小管。医学のあゆみ 114, 1050-1052 (1980)。
4. Isselbacher, K. J. and Greenberg, N. J.: Metabolic effects of alcohol on the liver. N. Engl. J. Med. 270, 402-410 (1964)。
5. Volentine, G. D., Tuma, D. J. and Sorrell, M. F.: Subcellular location of secretory proteins retained in the liver during the ethanol induced inhibition of hepatic protein secretion in the rat. Gastroenterology 90, 158-165 (1986)。
6. Volentine, G. D., Tuma, D. J. and Sorrell, M. F.: Acute effects of ethanol on hepatic glycoprotein secretion in the rat *in vivo*. Gastroenterology 86, 225-229 (1984)。
7. Baraona, E., Leo, M. A., Borowsky, S. T. and Lieber, C. S.: Alcoholic hepatomegaly: Accumulation of protein in the liver. Science 190, 794-795 (1975)。
8. Tuma, D. J., Jenett, R. B. and Sorrell, M. F.:

- Effect of ethanol on the synthesis and secretion of hepatic secretory glycoproteins and albumin. *Hepatology* **1**, 590-598 (1981).
9. Jeejeebhoy, K. N., Phillips, M. J., Bruche-Robertson, A., Ho, J. and Sodtke, U.: The acute effect of ethanol on albumin, fibrinogen and transferrin synthesis in the rat. *Biochem. J.* **126**, 1111-1126 (1972).
  10. Lieber, C. S.: Alcohol, protein metabolism, and liver injury. *Gastroenterology* **79**, 373-390 (1980).
  11. Stibler, H., Borg, S. and Allgulander, C.: Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Med. Scand.* **206**, 275-281 (1979).
  12. Morell, A. G., Irvine, R. A., Sternlieb, I., Scheinberg, I. H. and Ashwell, G.: Physical and chemical studies on ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* **243**, 155-159 (1968).
  13. Morell, A. G., Gregoriadis, G., Scheinberg, H., Hickman, J. and Ashwell, G.: The role of sialic acid in determining the survival of glycoprotein in the circulation. *J. Biol. Chem.* **246**, 1461-1467 (1971).
  14. Hudgin, R. L. and Ashwell, G.: Studies on the role of glycosyltransferases in the hepatic binding of asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* **249**, 7369-7372 (1974).
  15. Mancini, G., Oarbomara, A. O. and Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* **2**, 235-254 (1965).
  16. Lange, C. F.: A simplified batch method for the isolation of alpha glycoproteins from normal and pathological serum and urine. *Clin. Chim. Acta* **18**, 459-464 (1967).
  17. Lieber, C. S. and DeCarli, L. M.: Quantitative relationship between amount of dietary fat and severity of alcoholic fatty liver. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**, 474-478 (1970).
  18. Hunter, W. N.: 17 Radioimmunoassay, In: Weir, D. M. Handbook of experimental immunology. 2nd ed., 1-36, Blackwell Scientific Pub, Oxford (1973).
  19. Seglen, P. O.: Preparation of rat liver cells. *Exp. Cell. Res.* **82**, 391-398 (1973).
  20. Weigel, P. H. and Oka, J. A.: The surface content of asialoglycoprotein receptor on isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **258**, 5089-5094 (1983).
  21. Scatchard, G.: The attractions of protein for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 660-672 (1949).
  22. Bridge, K., Harford, J., Ashwell, G. and Klausner, R. D.: Fate of receptor and ligand during endocytosis of asialoglycoproteins by isolated hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 350-354 (1982).
  23. Schwartz, A. L., Fridovich, S. E. and Lodish, H. F.: Kinetics of internalization and recycling of the asialoglycoprotein receptor in a hepatoma cell line. *J. Biol. Chem.* **257**, 4230-4237 (1982).
  24. Weigel, P. H.: Evidence that the hepatic asialoglycoprotein receptor is internalized during endocytosis and that receptor recycling can be uncouple from endocytosis at low temperature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1419-1425 (1981).
  25. 大島一洋, 小浜貴良, 長田淳一, 近清裕一, 中嶋克行, 小平 司: 血清酸可溶性蛋白測定の臨床的意義. *臨床病理* **31**, 886-890 (1983).
  26. 江藤公喜: 新しい血清ムコタンパク (ASP) の定量法, 機器. *試薬* **5**, 801-808 (1982).
  27. Skrede, S., Blomhoff, J. P., Elgjo, K. and Gjone, E.: Serum proteins in disease of the liver. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2**, 399-406 (1975).
  28. Mihas, A. A.: Serum  $\alpha_1$ -antitrypsin levels in alcoholic hepatitis. *Digestion* **17**, 275-277 (1978).
  29. Sarcione, E. J.: Synthesis of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein by isolated perfused rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **100**, 516-519 (1963).
  30. Andus, T., Gross, V., Tranthi, T., Schreiber, G., Nagashima, M. and Heinrich, P.: The biosynthesis of acute-phase proteins in primary cultures of rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **133**, 561-571 (1983).
  31. Gahmberg, C. G. and Andersson, L. C.: Leukocyte surface origin of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (orosomucoid). *J. Exp. Med.* **148**, 507-521 (1976).
  32. Lenten, L. V. and Ashwell, G.: Studies on the chemical and enzymatic modification of glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **246**, 1889-1894 (1971).
  33. Stibler, H. and Borg, S.: Evidence of reduced sialic acid content in serum transferrin in male alcoholics. *Alcoholism* **5**, 545-549 (1981).
  34. 三宅和彦, 伊藤善志通, 鳥居正通: 薄層ポリアクリルアミド等電点電気泳動による異常  $\alpha_1$ -アンチトリプシンの検出. *臨床検査* **29**, 27-32 (1985).
  35. Lenten, L. V. and Ashwell, G.: The binding of desialylated glycoproteins by plasma membrane of rat liver. *J. Biol. Chem.* **247**, 4633-4640 (1972).

36. Pricer, W. E. and Aschwell, G.: The binding of desialylated glycoproteins by plasma membrane of rat liver. *J. Biol. Chem.* **246**, 4825-4833 (1971).
37. Tuma, D. J. and Sorrell, M. F.: Effects of ethanol on glycoprotein synthesis and secretion during inflammation induced stimulation of hepatic glycoprotein secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 303-311 (1982).
38. Mailliard, M. E., Sorrell, M. F., Volentine, G. D. and Tuma, D. J.: Impaired plasma membrane glycoprotein assembly in the liver following acute ethanol administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 951-958 (1984).
39. Baraona, E., Matsuda, Y., Pikkarinen, P., Finkelmann, F. and Lieber, C. S.: Exaggeration of the ethanol-induced decrease in liver microtubules after chronic alcohol consumption. *Gastroenterology* **76**, 1274 (1979).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学内科学第4講座 松本修二